

)

RIZIKÓ TÉNYEZŐK A VÉNÁS THROMBOEMBOLIÁS MEGBETEGEDÉSEK KIALAKULÁSÁBAN

**(KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A FIBRINOLITIKUS RENDSZER SZEREPÉRE, VALAMINT
A VELESZÜLETETT PROTEIN C HIÁNY VÉRALVADÁSI ÉS GENETIKAI
DIAGNOSZTIKÁJÁRA)**

PhD TÉZISEK

**Dr. Dávid Marianna
I.sz. Belgyógyászati Klinika**

**Témavezető: Prof.Dr. Losonczy Hajna
I.sz. Belgyógyászati Klinika**

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Pécs, 2001.**

1. BEVEZETÉS

1.1. VÉNÁS THROMBOEMBOLIÁS MEGBETEGEDÉSEKRE VONATKOZÓ INCIDENCIA ADATOK

A thromboemboliás megbetegedések világszerte vezetik a mortalitási statisztikákat. Epidemiológiai adatok szerint a mélyvénás thrombosis éves gyakorisága az átlag populációban kb. 160/100.000, az életkor előrehaladtával növekszik. A pulmonalis embolia tünetekkel járó, de nem fatális formájának gyakorisága 20/100.000 lakos évente, a halálos kimenetelű, boncolással diagnosztizált formáé 50/100.000 lakos. A pulmonalis embolia ma is a kórházi betegek vezető halál oka. A krónikus vénás elégtelenség incidenciája 3 évvel a mélyvénás thrombosis követően 35-69%, míg 5-10 év múlva 49-100% (a thrombosis kiterjedésétől függően).

Magyarországon évente több százezen szenvedik a thrombosis következményeit és hazai irodalmi adatok alapján a thromboemboliás megbetegedésekből származó halálozás 20/100.000 lakos. A vénás betegségek mortalitása hazánkban az utóbbi két évtizedben gyakorlatilag megduplázódott.

1.2. A THROMBOPHILIA FOGALMA ÉS ÖRÖKLÖDÉSE A MONOGÉNES FORMÁTÓL A MULTIGÉNESISIG

Korábban a thrombophilia fogalma alatt veleszületett thrombosis késztséget értettek és az először felismert inhibitor defektusok (anti-thrombin-, protein C és protein S hiány, dysfibrinogenaemiák) okozta fokozott thrombosis késztség leírására alkalmazták. Ezek az öröklött véralvadási rendellenességek önmagukban, szerzett rizikó tényezők jelenléte nélkül is hajlamosítanak thromboemboliás megbetegedések kialakulására és ismétlődésére. Klinikai jellemzőik a fiatal életkorban fellépő, ismétlődő, szokatlan lokalizációban jelentkező, gyakran családi halmozódást mutató elsősorban vénás thromboemboliák. Egeberg és mások munkái alapján gondolkodásunk az irányba terelődött, hogy a thrombophilia egy gént érintő, ún. monogénes megbetegedés, autoszom domináns módon öröklődik, inkomplett penetranciával. Ezt az elképzelést 15-20 évvel később tovább támogatták azok a közlemények, melyek leírták a protein C és a protein S hiányt, valamint az ezekkel járó fokozott vénás thromboembolia rizikót.

A familiáris thrombophilák monogénes öröklődése először 1985 táján kérdőjeleződött meg, amikor kiderült, hogy hereditér protein C hiány esetén a heterozigóta családtagok egy része egész életében tünetmentes marad (ez autoszom domináns öröklődés esetén nem lenne lehetséges). Mintha valamilyen egyéb tényező (rizikó faktor vagy másik genetikai zavar) jelenléte is szükséges lenne a betegség manifestálódásához. Két kérdés merült fel: az egyik, hogy a veleszületett protein C hiány valóban fokozott thrombosis késztséggel jár-e, a másik, hogy protein C hiányos családoknál egyéb genetikai rizikó faktor szerepel-e a thromboemboliás megbetegedések kialakulásában. Az első kérdés megválaszolása nem okozott nagyobb problémát. Meghatározták a protein C hiány prevalenciáját az egészséges populációban, valamint a thrombosison átesett betegekben, és igazolták, hogy a protein C hiány többszörösére fokozza a thromboembolia rizikót. A második kérdés megválaszolása azonban komoly nehézségekbe ütközött. Azokban az időkben ugyanis az ismert genetikai rizikó faktorokkal (anti-thrombin-, protein C-, protein S hiány, dysfibrinogenaemiák) a veleszületett thrombosis késztséggel járó állapotoknak csak kb. 10-15%-a volt megmagyarázható még a thrombophilásnak minősített családok esetében is, ezért kombinált defektust igazolni igen ritkán lehetett. 1993-ban jelentős változás következett be az aktivált protein C rezisztencia – egy gyakori, enyhébb rizikó tényező – felfedezésével és genetikai hátterének igazolásával. Hamarosan ismertté vált, hogy a veleszületett protein C hiányban szenvedő betegek kb. 20%-a rendelkezik az V-s faktor ún. Leiden mutációjával, melyet az aktivált protein C rezisztenciában szenvedő betegek mintegy 90-95%-ában lehetett igazolni. Ezidőtájt számos vizsgálat látott napvilágot, melyek már felvetették a hereditér thrombophilia több génen keresztül, ún. multigénes öröklődésének lehetőségét.

Az utóbbi időben a thrombophilia fogalma kiszélesedett és a veleszületett rizikó tényezőkön kívül a szerzett thrombosis készség fokozódások is beletartoznak. A thrombophilia fogalma alatt manapság (tágabb értelemben) a haemostasis azon öröklött vagy szerzett rendellenességeit értjük, melyek thromboemboliás megbetegedések kialakulására hajlamosítanak.

1.3. A THROMBOEMBOLIÁS MEGBETEGEDÉSEK LÉTREJÖTTÉBEN SZEREPET JÁTSZÓ PATOFIZIOLÓGIAI TÉNYEZŐK

A legfontosabb patofiziológiai tényezőket, melyek szerepet játszanak a thromboemboliás megbetegedések kialakulásában Virchow már 1856-ban közölte. Ezek az **érfal rendellenességei**, a vér áramlási tulajdonságainak (**stasis**), valamint összetevőinek (**véralvadási zavar**) megváltozása. Az egyes komponensek jelentősége azonban attól függően eltérő, hogy a thrombotikus esemény a vénákban, az artériákban vagy a kiserekben jön létre. A fenti változásokban szerepet játszó kockázati tényezők szerettek és veleszületettek lehetnek, valamint olyanok, melyek veleszületett és szerzett módon egyaránt kialakulhatnak.

1.4. SZERZETT KOCKÁZATI TÉNYEZŐK A VÉNÁS THROMBOEMBOLIÁS MEGBETEGEDÉSEK KIALAKULÁSÁBAN

- **rosszindulatú daganatos betegségek** (kompresszió, cancer procoagulant A termelés)
- **szívelégtelenség** (vénás stasis)
- **nephrosis syndroma** (AT-III kiürülés a proteinuria részeként)
- **varicositas** (vénás stasis)
- **antifoszfolipid antitestek** (lupus anticoagulans, komplex haemostasis zavar)
- **műtétek** (nagy hasi: VTE: 30%, elektív ortopédiai: MVT: 50- 60%, PE: 2- 30%)
- **immobilizáció** (gipsz rögzítés, agyi esemény következtében, posztoperatív állapot, stb.)
- **terhesség** (rizikó fokozódás: 4- 7x, szabad protein S, antithrombin és aktivált protein C szint csökkenés, vénás stasis)
- **posztpartum időszak** (rizikó fokozódás: további 2-3x)
- **fogamzásgátlók** (ösztrogén tartalom, rizikó fokozódás 2-8x)
- **hormonpótló terápia** (nőgyógyászatban és a prostata carcinoma terápiája során)
- **hyperviscositas syndromával járó állapotok** pl. polycythaemia vera, myeloma multiplex
- **traumák** (érfal károsodás, procoagulans anyag kiáramlás)
- **obesitas** (vénás stasis)
- **idős kor** (vénás stasis, véralvadás aktiváció)
- **korábbi thromboemboliás megbetegedések**

1.5. KOCKÁZATI TÉNYEZŐK, MELYEK VELESZÜLETETT ÉS SZERZETT MÓDON EGYARÁNT KIALAKULHATNAK

- **hyperhomocisztinaemia**
- **magas FVIII szint**
- **csökkent fibrinolitikus aktivitás**

A FIBRINOLITIKUS RENDSZER MŰKÖDÉSE ÉS A THROMBOEMBOLIÁS MEGBETEGEDÉSEK

Isacson 1972-ben hívta fel a figyelmet először a fibrinolitikus rendszer zavarára idiopathiás vénás thrombosisok kapcsán. Vénás okklúziós tesztet követően csökkent fibrinolitikus aktivitást észlelték thromboemboliában szenvedő betegek mintegy 30-50%-ában. Harbourm és munkatársai

csökkent fibrinolitikus aktivitást igazoltak visszatérő idiopathiás thrombosisokban szenvedő betegek 86%-ánál, miközben szekunder mélyvénás thrombosisok kapcsán csak 29%-ban fordult elő. Mindezek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a csökkent fibrinolitikus aktivitásnak etiológiai szerepe lehet az un. idiopathiás vénás thrombosisok kialakulásában. A későbbi vizsgálatok során a hypofibrinolízis hátterében először csökkent aktivátor aktivitást (t-PA), majd emelkedett inhibitor szinteket (PAI-1) igazoltak.

A globális fibrinolitikus tesztek alapján az a legvalószínűbb, hogy a fibrinolízis aktivációja és inhibíciója közötti egyensúly a legfontosabb tényező a fibrinolitikus kapacitás meghatározásában. Epidemiológiai vizsgálatok során felmerült a genetikai predispozíció lehetősége is:

1. PAI-1: a PAI-1 gén promóter régiójában írtak le egy specifikus inzerció/deléción polimorfizmust, melyben az egyik allél szekvencia 4 guanint, a másik 5 guanint tartalmaz. In vivo vizsgálatok alapján a 4 guanin tartalmú allélra homozigóta egyéneknek magasabb plazma PAI-1 koncentrációk észlelhetők. Egy fiatal férfiakon végzett vizsgálat során a 4G allél jelenléte 2x-s rizikó fokozódást jelentett coronaria thrombosisra, míg egy középkorú férfiakon végzett nagy vizsgálat nem talált összefüggést. Tehát a thrombosis rizikóit illetően az eredmények ma még nem egyértelműek.

2. t-PA: összefüggést igazoltak a t-PA gén egy Alu-repeat-jében észlelhető inzerció/deléción polimorfizmus és a thromboemboliás megbetegedések között, ez az összefüggés azonban nem nyert bizonyítást az ECAT studyban.

Az euglobulin lízis idő mérése a humán plazma globális fibrinolitikus aktivitásának meghatározására szolgál. A plazmából pH 5.3-nál kicsapódó euglobulin frakció tartalmazza a fibrinolitikus enzimrendszer komponenseit a fibrinogénnel együtt, a gátló anyagok egy részének kivételével. Az euglobulin frakció feloldása és thrombinnal való megalvasztása után az alvadék oldódási idejét regisztráljuk. Ebben a vizsgálati rendszerben az extrinsic plazminogén aktivációnak tulajdonítanak jelentőséget. Anti-t-PA antitestek alkalmazása megnyújtja az euglobulin lízis időt.

Irodalmi adatok alapján nem igazolódott összefüggés a t-PA antigén koncentrációk és az euglobulin lízis idő között, viszont szoros összefüggést találtak az euglobulin lízis idő és a PAI-1 antigén szintek, valamint az euglobulin lízis idő és a t-PA aktivitás között. Úgy tűnik, hogy a plazma euglobulin frakciójában a t-PA aktivitás meghatározásában a PAI-1 szinteknek jelentőségük van. Azonban, hogy pontosan mely aktivátor rendszerek érintettek még az euglobulin lízis idő kialakításában, az további vizsgálatokat igényel problémá.

1.6. VELESZÜLETETT KOCKÁZATI TÉNYEZŐK A VÉNÁS THROMBOEMBOLIÁS MEGBETEGEDÉSEK KIALAKULÁSÁBAN

A hereditár thrombophilia genetikailag meghatározott hajlam elsősorban vénás thromboemboliás megbetegedések kialakulására. Olyan primer hyperkoagulabilitás, mely az ismert, szerzett rizikó tényezők jelenléte nélkül, önmagában is képes thromboemboliás megbetegedéseket létrehozni, és jellemzi az ismétlődések fokozott kockázata is.

Manapság az alábbi veleszületett kockázati tényezők ismertek:

- antithrombinopathiák
- protein C hiány
- protein S hiány
- FV:Q506 (FV Leiden mutáció)
- FII G20210A allél jelenléte
- dysfibrinogenaemiák egyes típusai

Veleszületett tényezők, melyek rizikó szerepe nem egyértelműen bizonyított:

thrombomodulin defektus, heparin kofaktor II hiány, plazminogén deficiencia, magas hisztidin-rich-glikoprotein szint, magas PAI-1 szint, PLA² allél jelenléte

A HEREDITER PROTEIN C HIÁNY

A hereditár protein C hiány autoszómálisan öröklődő megbetegedés, melynek heterozigóta formája mintegy 5-10-szeresére fokozza a vénás thromboembolia rizikót. A rizikó jelentősen nő egy másik inhibitor defektus, vagy környezeti rizikó tényező egyidejű jelenléte esetén. Thrombophilias betegekben a protein C hiány prevalenciája 2-9%, fiatal betegek visszatérő vénás thrombosisai esetén elérheti a 10-15%-ot. A heterozigóta protein C hiány prevalenciája az átlagpopulációban relatíve magasabb: 0.1-0.3%, közülük a többség nem rendelkezik pozitív családi anamnézissel. Mivel a plazma protein C koncentrációját illetően átfedés figyelhető meg a normális egyének és a heterozigóta protein C hiányos betegek eredményei között, úgy tűnik, hogy a plazma protein C koncentrációja nem elsődleges meghatározója a megbetegedésnek. Gyakran mérhetetlen, vagy igen alacsony protein C koncentrációk mellett és a heterozigóta állapotok egy részében sem találunk klinikai tüneteket. Mindezek a korábban dominánsnak hitt öröklésment mellett felvetik a recesszíven öröklődő protein C hiány lehetőségét is. Fenotípust illetően kétféle állapot különíthető el:

I-s típus: gyakoribb, a protein C aktivitás és antigén szintek párhuzamos csökkenése jellemzi, melyet csökkent protein szintézis, vagy a protein C molekulák csökkent stabilitása okoz.

II-s típus: a protein C biológiai aktivitásának csökkenése jellemzi (mind az anticoagulans aktivitást - koagulációs módszer, mind a szintetikus szubszttráttal mért proteáz aktivitást illetően - amidolitikus módszer), megtartott antigén koncentrációk mellett, abnormálisan működő protein C molekula szintetizálódása révén.

A protein C cDNS-t és gént Foster klónoztta és szekvenálta az 1980-as évek közepén. A gén a 2-s kromoszómán helyezkedik el q13-q14-es pozícióban, 11,6 kb hosszúságú, 9 exont és 8 intront tartalmaz, melyek közül az első exon nem íródik át. A protein C génje nagy homológiát mutat más K vitamin dependens szerin proteázok génjével, mint a FII, FVII, FIX, FX és mai ismereteink szerint ennek az az oka, hogy ezek a gének egy közös génből fejlődtek ki.

Reitsma és mtsai az 1995-ben megjelent protein C génre vonatkozó mutációs adatbázisban a protein C génben előforduló abnormalitások egész sorát írták le. A 334 beteg 160 féle genetikai eseményét tartalmazó adatbázisban legnagyobb számban a missense mutációk (66%) fordultak elő, melyek I-s típusú protein C hiányt okoztak és heterozigóta állapottal jártak.

Az adatbázist áttekintve kiderül, hogy genetikai abnormalitások egész sora figyelhető meg a protein C gén mind a 9 exonjában, így protein C hiányos, thrombophiliasban szenvedő betegekben a teljes protein C gén genetikai vizsgálata indokolt. Nagyszámú beteg vizsgálata esetén a direkt szekvenálás rendkívül költség és időigényes procedura. A szűrő módszerek elterjedése lehetővé tette, hogy a mutációt valamely génszakaszra lokalizáljuk és később a figyelmet a mutáns génszakaszra irányítva végezzük el a szükséges szekvenálást. A polimeráz láncreakció (PCR) és a denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) kombinációját 1994-ben Gandrille és munkatársai alkalmazták először a protein C génben előforduló mutációk szűrésére. A módszer az alacsony guanin-citozin tartalmú exonok vizsgálatára alkalmas. Japán szerzők néhány éve PCR és egyláncú konformációs polimorfizmus vizsgálat (SSCP) kombinációját javasolták a protein C génben előforduló mutációk szűrésére.

A hereditár protein C hiány genetikai vizsgálatáról szóló adatok elsősorban a nyugati országokból és Japánból származnak, Magyarországon elsőként közlünk mutáció szűréssel és verifikálással kapcsolatos adatokat csökkent protein C anticoagulans aktivitással rendelkező betegekben.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. A FIBRINOLITIKUS RENDSZER MŰKÖDÉSÉVEL KAPCSOLATOS VIZSGÁLATAINK CÉLKITŰZÉSEI

1. Az euglobulin lízis idő (ELI), valamint a t-PA és a PAI-1 aktivitások, a t-PA és a PAI-1 antigén szintek közötti összefüggés vizsgálata 27 egészséges önkéntesben annak megállapítására, hogy mely aktivátor vagy inhibitor rendszer játszik szerepet az euglobulin lízis idő meghatározásában.

2. Okklúziós tesztet követően mért euglobulin lízis idő eredmények alapján az önkéntesek reszponder státuszának megállapítása majd a fibrinolízis vizsgálatok (t-PA és PAI-1 aktivitások, t-PA és PAI-1 antigén szintek, plazminogén, antiplazmin) értékelése a reszponder csoportokat figyelembe véve.

3. A fibrinolitikus aktivitás (ELI, t-PA és PAI-1 aktivitások, t-PA és PAI-1 antigén szintek) longitudinális változásának vizsgálata 4 egymást követő héten ismételt mérések segítségével 12 egészséges önkéntesben.

4. A reszponder státusz változásának vizsgálata a fibrinolízis 4 hetes longitudinális elemzése során egészséges önkéntesekben, vagyis annak meghatározása, hogy a jól és a rosszul reagáló státusz a követési idő alatt mindvégig változatlan marad, vagy mutat eltérést bizonyos önkéntesek esetében.

5. Fibrinolízis vizsgálatok (euglobulin lízis idő, t-PA és PAI-1 aktivitás okklúziós tesztet megelőzően és azt követően) végzése hereditár antithrombinopathiás betegekben annak megállapítására, hogy a fibrinolitikus rendszer zavara milyen szereppel bír ezen betegek thromboemboliás megbetegedéseinek kialakulásában.

6. Hemoreológiai- (plazma és teljes vér viszkozitás, erythrocyta aggregáció), véralvadási és genetikai vizsgálatok (protein C, protein S aktivitás, lupus anticoagulans, FV Leiden mutáció, FII 20210A allél jelenléte, MTHFR C677T mutáció) végzése hereditár antithrombinopathiás betegekben annak megállapítására, hogy egyéb szerzett és veleszületett rizikó tényezők milyen szerepet játszanak ezen betegek thromboemboliás megbetegedéseinek kialakulásában.

2.2. A CSÖKKENT PROTEIN C AKTIVITÁSSAL RENDELKEZŐ BETEGEKEN VÉGZETT VÉRALVADÁSI ÉS GENETIKAI VIZSGÁLATAINK CÉLKITŰZÉSEI

1. Célunk volt vizsgálni, hogy csökkent protein C aktivitással rendelkező betegeknél és családtagjaiknál (34 család 47 tagjánál) milyen gyakorisággal észlelhetők genetikai defektusok a protein C génben.

2. Mely genetikai defektusok fordulnak elő gyakrabban hazánkban a hereditár protein C hiányos betegeknél?

3. Milyen egyéb inhibitor defektusok észlelhetők az alacsony protein C aktivitással és a protein C génben mutációval rendelkező betegekben?

4. A genetikai defektus meghatározza-e a klinikai kép alakulását?

5. Van-e összefüggés a protein C aktivitások alakulása és a FV:Q506 jelenléte között?

6. Mi a jelentősége a genetikai vizsgálatoknak hereditár protein C hiányban ?
7. A protein C génben mutációval nem rendelkező, alacsony protein C aktivitású betegek véralvadási és egyéb genetikai vizsgálati eredményeinek értékelése.
8. Alkalmasság-e az irodalomban ajánlott szűrő módszerek (denaturáló gradiens gélelektroforézis - DGGE, egyláncú konformációs polimorfizmus vizsgálat - SSCP) a protein C génben előforduló mutációk szűrésére ?
9. Új, eddig nem közölt genetikai eltérések leírása magyar protein C hiányban szenvedő betegekben.

3. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A FIBRINOLITIKUS RENDSZER VIZSGÁLATA

3.1.1. ÖNKÉNTESK, BETEGEK

A korrelációs vizsgálatokba, valamint a rezponder státusz megállapítását célzó vizsgálatokba 27, a fibrinolízis longitudinális változásának vizsgálatába 12 egészséges önkéntest vontunk be. Mindkét vizsgálatba bevont önkéntesek írásbeli beleegyező nyilatkozatot adtak, a vizsgálatokat az POTE Etikai Bizottságának engedélyével folytattuk a 90-es évek elején.

Az antithrombinopathiás betegeken végzett fibrinolízis-, hemoreológiai- és részletes véralvadási, valamint genetikai vizsgálatok 11 veleszületett antithrombin defektusban szenvedő betegnél történtek.

3.1.2. VÉRMENTÁK

A vérvételeket cubitalis vénából végeztük 3.8%-os nátrium citrátot tartalmazó csövekbe (1:9 arányban) reggel 8 óra és 9.30 között 12 órás éhezést és 30 perces nyugalmi periódust követően. A t-PA és PAI-1 aktivitás és antigén szint meghatározáshoz szükséges vérvételek Stabilyte csövekbe történtek (MONOVETTE, CHROMOGENIX), melyek a thrombocytá PAI-1 kiáramlás megakadályozására alacsony pH-t biztosítanak, citrátot, teophyllint, adenint tartalmaznak. A vérvételek, valamint a plazma előkészítés és feldolgozás fibrinolízis vizsgálatokhoz a Leiden Fibrinolysis Workshop ajánlásainak megfelelően történt.

3.1.3. VÉRALVADÁSI LABORATÓRIUMI MÓDSZEREK:

Egészséges önkénteseken és antithrombinopathiás betegeken végzett fibrinolízis vizsgálatok: Az euglobulin lízis idő mérése Kowalski módszere szerint történt, a t-PA aktivitást COATEST BIA t-PA, a PAI-1 aktivitást COATEST PAI reagenssekkal (CHROMOGENIX), a t-PA és PAI-1 antigén szinteket ELISA módszerrel, COALIZA t-PA és COALIZA PAI-1 reagenssekkal (CHROMOGENIX) Dynatech ELISA Readeren mértük. A plazminogént és az antiplazmint COATEST Plazminogén és Antiplazmin reagenssekkal (KABI), a D-dimert Latex D-dimer (KORDIA), a fibrinogént Thromborel S (BEHRING) reagenssekkal mértük.

Az antithrombinopathiás betegekben végzett egyéb véralvadási és hemoreológiai vizsgálatok: Az antithrombin aktivitás meghatározáshoz IL Antithrombin-t, az antithrombin antigén meghatározáshoz anti-human antithrombin III poliklonális antitestet (DAKO) használtunk (rakéta elektroforézis módszer Laurell szerint), az antithrombin III fehérje abnormalitás vizsgálatára kétdimenziós keresztezett

immunelektroforézist végeztünk. A protein C aktivitás és protein S aktivitás mérés IL ProClot illetve IL Protein S reagensekkel történt. A teljes vér és plazma viszkozitás meghatározások a POTE I. sz. Sebészeti Klinika akkor még működő Hemoreológiai Laboratóriumával együttműködésben történtek HEVIMET 40 kapilláris viszkoziméteren. Az erythrocyta aggregáció meghatározásokat MYRENNE MA-1 aggregométeren végezték ugyanott.

Vénás okklúziós teszt: Az euglobulin lízis időt, a t-PA és a PAI-1 aktivitásokat vénás okklúziós tesztet követően is meghatároztuk. Az első vérvételt követően vérnyomásmérő mandzsettát helyeztünk a felkarra és 20 percre felfújtuk a szisztolés- diasztolés középnyomásra. Ezt követően a vérvételt ugyanabból a végtagból megismételtük.

Protokoll a fibrinolízis longitudinális vizsgálatához: Euglobulin lízis idő, t-PA és PAI-1 aktivitás meghatározások történtek vénás okklúziós tesztet megelőzően és azt követően az 1., a 7., a 14., a 21. és a 28. napon. t-PA és PAI-1 antigén szintek mérésére az 1. és a 28. napon került sor, vagyis 4 héten keresztül követtük a fibrinolitikus aktivitás alakulását egészséges önkéntesekben.

Genetikai vizsgálatok: Az antithrombinopathiás betegeken elvégeztük a FV: Q506 (Leiden mutáció), FII 20210A allél jelenlétére és az MTHFR C677T pontmutációra vonatkozó vizsgálatokat. A vizsgálatok fagyasztott vérmintából évekkal a fibrinolízis vizsgálatokat követően történtek. A defektusok többsége a 1990-es évek elején még nem volt ismert.

Statisztikai elemések: Az adatokat átlag \pm standard deviáció (SD) formájában adtuk meg. Spearman féle korrelációs együttható számítások történtek bizonyos adatok közötti összefüggések meghatározása céljából. 95%-os konfidencia intervallumokat számítottunk. A szignifikancia számítások kétmintás t-próba segítségével történtek. A becsült relatív rizikóra vonatkozó számításokhoz χ^2 próbát alkalmaztunk.

3.2. BETEGEK, VALAMINT VÉRALVADÁSI ÉS GENETIKAI MÓDSZEREK A HEREDITER PROTEIN C HIÁNY DIAGNOSZTIKÁJÁBAN

3.2.1. BETEGEK

Az elmúlt 4 évben 300 vénás thromboemboliában szenvedő betegnél történtek klinikánkon részletes véralvadási, immunológiai és genetikai vizsgálatok hereditár thrombophilia irányában. Az elvégzett vizsgálatok alapján az alábbi veleszületett és szerzett thrombosiskészséggel járó állapotokat azonosítottuk:

Antithrombinopathia:

| | | | |
|-----------|----------|-----------|--------|
| I. típus | 6 beteg | Összesen: | (7.6%) |
| II. típus | 13 beteg | | |

Protein C hiány:

| | | | |
|-----------|----------|-----------|--------|
| I. típus | 15 beteg | Összesen: | (8.6%) |
| II. típus | 11 beteg | | |

Protein S hiány:

| | | | |
|-------------|----------|-----------|---------|
| I+II. típus | 24 beteg | Összesen: | (11.6%) |
| II. típus | 11 beteg | | |

| | | | |
|---------------------------------|----------|--|---------|
| <u>APC rezisztencia:</u> | 89 beteg | | (29.8%) |
|---------------------------------|----------|--|---------|

| | | | |
|------------------------------------|----------|--|--------|
| <u>Lupus anticoagulans:</u> | 11 beteg | | (3.6%) |
|------------------------------------|----------|--|--------|

| | | | |
|--|-----------|--------------------------|---------------------------------|
| <u>Hyperhomociszteinémia:</u> | 57 beteg | | (19%) |
| <u>FV:Q506 (Leiden mutáció)</u> | | | <u>Allél frekvencia:</u> |
| Homozigóta: | 13 beteg | (4.3%) | 8.6% |
| Heterozigóta: | 68 beteg | (22.6%) | 22.6% |
| Összesen: | 81 beteg | (APC rezisztensek 91%-a) | |
| <u>FII 20210A allél</u> | | | <u>Allél frekvencia:</u> |
| Homozigóta: | 0 beteg | | |
| Heterozigóta: | 20 beteg | (6.6%) | 6.6% |
| Összesen: | 20 beteg | | |
| <u>MTHFR C677T mutáció</u> | | | <u>Allél frekvencia:</u> |
| Homozigóta | 39 beteg | (13%) | 26% |
| Heterozigóta | 132 beteg | (44%) | 44% |
| Összesen: | 171 beteg | | |

A betegek 43%-nál recidivált a thromboemboliás megbetegedés, szignifikáns különbség volt észlelhető a hereditár thrombophiliával rendelkező és nem rendelkező betegek recidiva készsége között ($p=0.0042$). Ugyancsak szignifikáns különbséget igazoltunk a kumarin kezelésben részesülő és nem részesülő betegek recidiva aránya között ($p<0.0001$).

Krónikus vénás elégtelenség szignifikánsan nagyobb számban alakult ki thrombophiliás betegekben ($p = 0.001$), a thrombophilia okozta relatív rizikó náluk: 2.16 volt (95%-os konfidencia intervallum: 1.36- 3.43). Ulcus cruris ugyancsak szignifikánsan gyakrabban volt észlelhető veleszületett thrombosiskészséggel rendelkezőknél ($p= 0.0018$), a thrombophilia okozta relatív rizikó 5.1-nek bizonyult (95%-os konfidencia intervallum: 1.66- 15.6).

A thrombophilia irányában vizsgált betegek közül 26 család 38 családtagjánál (300 betegből 8.6%-ban) mértünk ismételt vizsgálatokkal alacsonyabb protein C anticoagulans aktivitást. Prof. Sas Géza jóvoltából módunk nyílt Budapesten, az Országos Hematológiai és Immunológiai Intézetben gondozott, thrombophilia irányú vizsgálatok során alacsony protein C anticoagulans aktivitással rendelkező 8. család 9 tagjának vizsgálatát is elvégezni. Összesen tehát 34 család 47 tagjánál, 39 thromboembolián átesett betegen és 8 egészséges családtagon történtek részletes véralvadási és genetikai vizsgálatok.

3.2.2. VÉRALVADÁSI LABORATÓRIUMI VIZSGÁLATOK ÉS PLAZMA HOMOCISZTEIN SZINT MEGHATÁROZÁS PROTEIN C HIÁNYOS BETEGEKBEN

A véralvadási vizsgálatok 1:9 arányú 3.8%-os trinátrium citráttal alvadásgátolt vérből történtek. A Protein C anticoagulans aktivitásának meghatározását IL (Instrumentation Laboratories) ProClot reagenssel végeztük, a protein C antigén szintek meghatározását anti- human protein C polyclonalis antitesttel (DAKO) Laurell féle rakéta elektroforézis módszerrel (185). Az AT-III aktivitás meghatározásához IL Antithrombin, az antithrombin antigén szintek méréséhez anti- human antithrombin polyclonalis antitesttel (DAKO) végzett Laurell féle rakéta elektroforézis módszert alkalmaztunk, a protein S aktivitás meghatározásához IL Protein S, a prothrombin aktivitás/INR és a fibrinogén meghatározásához STAGO Neoplastine reagenst, a plazminogén és az antiplazmin szintek meghatározásához IL Plasminogen, IL Alpha-2-antiplazmin reagenseket, az APC hányados meghatározásához Behring APC resistance kit-et, a lupusz anticoagulans meghatározásához STAGO APTT-LA reagenst használtunk. Valamennyi nem citált metodika a rutin véralvadási módszerek közé tartozik.

A tartós orális anticoagulans kezelésben részesülő betegeknek a kumarin leállítását követően kis molekulatömegű heparin prophylaxist alkalmaztunk 2 héten keresztül. A vérvételek 30 perces nyugalmi állapotot követően, minden esetben normális PTR/INR értékek mellett történtek.

A plazma homocisztein szint meghatározások a PTE, ÁOK, Központi Klinikai Kémiai Intézetében történtek IMx homocisztein immunoassay módszerrel IMx Analyser segítségével.

3.2.3. GENETIKAI VIZSGÁLATOK PROTEIN C HIÁNYOS BETEGEKBEN

GENOMIKUS DNS IZOLÁLÁS

A genetikai vizsgálatok a Fachhochschule Jena Biológia Tanszékével kollaborációban történtek. A betegek perifériás vérének fehérvérsejtjeiből Chelex 100 segítségével, módosított Walsh módszerrel genomikus DNS-t izoláltunk.

POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ

A protein C gén vizsgálatokhoz a PCR reakcióhoz használt primerek a 9c exonrésze kifejelesztett reverz primer kivételével megegyeztek a Gandrille és munkatársai által közöltekkel. A 9c exonrésze tervezett reverz primer szekvenciája a következő volt: TGT GCT TGT TAC ATG TCC CTT. A DGGE-t megelőzően végzett PCR reakció sajátossága, hogy a primerpárok egyikének 5' végéhez egy guanin-citozin tartalmú oligomert kapcsolnak, ez az ún. G-C clamp. A guaninban-citozinban gazdag szekvencia arteficialisan képes létrehozni egy magas olvadáspontú domént és ezzel az általunk vizsgált génszakaszt egy alacsonyabb stabilitású doménben helyezni. Ez azért fontos, mert a vizsgálandó génszakasznak az első olvadó doménben kell elhelyezkedni ahhoz, hogy a denaturáló gradiens gélelektroforézis során biztosan egyláncúvá váljon és ezáltal alkalmas legyen az értékelésre. A 9-s exont, a protein C gén leghosszabb kódoló génszakaszát 3, a 3-s exont 2 átfedő szegmentsben amplifikáltuk.

A heteroduplex képződés fokozása érdekében az amplifikálást követően egy speciális denaturáló-renaturáló hőprogramot alkalmaztunk, elősegítve ezzel a DNS kettős szálak denaturációját majd renaturációját, mely fokozott heteroduplex képződéssel jár heterozigóta állapotokban.

DENATURÁLÓ GRÁDIENS GÉLELEKTROFORÉZIS (DGGE)

Valamennyi amplifikátumot, melyet előzőleg denaturáló-renaturáló hőprogramnak tettünk ki 4M ureát és 30% formamidot, mint denaturáló ágenseket tartalmazó 6.5%-os poliakrilamid gélben futtatjuk 300V feszültséggel MOPS pufferben. Egy bizonyos urea koncentrációnál bekövetkezik a részleges olvadás, melynek során a guanin-citozinban gazdag szakasz (G-C clamp) még összetartja a DNS-t, tehát kétféleképpen, miközben a vizsgálandó génszakasz egyláncúvá válik. Ez a koncentráció különbözik heteroduplex és homoduplex képződés esetén. A részleges olvadás az elektroforetikus mobilitás drámai csökkenéséhez vezet és ezáltal éles csík jelenik meg az elektroforézis során.

EGYLÁNCÚ KONFORMÁCIÓS POLIMORFIZMUS (SSCP) VIZSGÁLAT

A magas G-C tartalmú exonok esetében (exon 4 és 5), valamint a 6, 8 és 9c exonrész esetében az SSCP analízis bizonyult a legeredményesebbnek. Az egyláncú DNS szálak komplex struktúrákat képeznek, sajátos alakzatot vesznek fel, s ez befolyásolja elektroforetikus mobilitásukat. Egyetlen bázis cseréje megváltoztatja ezt a konformációt, valamint ezzel együtt a DNS elektroforetikus mobilitását, s így lehetővé teszi mutációk identifikálását.

DNS SZEKVENÁLÁS

A DGGE vagy SSCP analízis során aberráns migrációt mutató amplifikált génszakaszokat ABI PRISM 310-es szekvenáló automata segítségével dideoxy módszerrel szekvenáltuk.

IV:Q506 LEIDEN MUTÁCIÓ VIZSGÁLATA

Genomikus DNS izolálás történt Chelex 100 segítségével, majd PCR reakciót végeztünk. Ezt követően a termékeket *Mnl*-1 restrikciós endonukleázzal emésztettük és 1%-os agaróz gélben futtattuk.

FII G20210A ALLÉL VIZSGÁLATA

Első lépésben genomikus DNS izolálás történt Chelex 100 segítségével módosított Walsh módszer szerint, majd a mutáns allélt tartalmazó génszakaszt amplifikáltuk PCR segítségével és SSCP vizsgálatot végeztünk a genetikai eltérés detektálására.

AZ MTHFR C677T PONTMUTÁCIÓ GENETIKAI VIZSGÁLATA

A metilén tetrahidrofolát reduktáz (MTHFR) enzim génjében előforduló pontmutáció (C677T) vizsgálata genomikus DNS izolálást követően PCR módszerrel történt. Majd az amplifikátumot *Hinf* I restrikciós endonukleázzal emésztettük és 3%-os agaróz gélben futtattuk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A FIBRINOLITIKUS RENDSZER VIZSGÁLATA SORÁN NYERT EREDMÉNYEK

4.1.1. ÖSSZEFÜGGÉS AZ EUGLOBULIN LÍZIS IDŐ, VALAMINT A t-PA AKTIVITÁS, A PAI-1 AKTIVITÁS, A t-PA ANTIGÉN ÉS A PAI-1 ANTIGÉN SZINTEK KÖZÖTT

Erős negatív korrelációt igazoltunk egészséges önkéntesekben az euglobulin lízis idő (ELI) és a t-PA aktivitások között ($r = -0.70$, $p < 0.001$, $y = -0.0017x + 1.15$). Gyengébb pozitív korreláció igazolódott az ELI és a PAI-1 aktivitás között ($r = 0.55$, $p < 0.05$, $y = 0.05x - 2.1$). Vizsgálataink nem igazoltak korrelációt az ELI és a t-PA antigén, valamint az ELI és a PAI-1 antigén szintek között.

4.1.2. A RESPONDER STÁTUSZ VIZSGÁLATA, JÓL ÉS ROSSZUL VÁLASZOLÓ ÖNKÉNTES

Megfigyeltük, hogy a 20 perces vénás okklúziót követően mért euglobulin lízis idő alapján az egészséges önkéntesek 2 csoportra voltak oszthatók. A rosszul válaszoló csoportjában az okklúziós tesztet követően az ELI 100 percnél volt, a jól válaszoló csoportjában 100 perc alatt. Nem volt különbség a 2 csoport között az önkéntesek életkorát, t-PA antigén szintjét, plazminogén, antiplazmin és fibrinogén szintjét illetően. Szignifikáns különbséget észleltünk az önkéntesek euglobulin lízis idejét ($p < 0.001$) és t-PA aktivitását illetően ($p = 0.05$) a jól és rosszul reagáló csoportok között. Nem volt szignifikáns különbség a PAI-1 aktivitásokat illetően a jól és a rosszul reagáló csoportok között.

Az ELI szempontjából elsősorban az okklúziós tesztet követően mért értékekben észlelhető a szignifikancia a két csoport eredményei között, a jól reagálókénál mértük a szignifikánsan rövidebb euglobulin lízis időt. A t-PA aktivitást illetően ugyancsak mind okklúziós tesztet megelőzően, mind azt követően különbség volt észlelhető, a jól reagálókénál szignifikánsan magasabb t-PA aktivitást mértünk.

A jelenség magyarázatát a PAI-1 antigén szintek mérésekor tudtuk megadni. A rosszul válaszoló csoportjában szignifikánsan magasabb PAI-1 antigén szinteket detektáltunk ($p = 0.01$), mely felelős lehet a rosszul reagáló alacsonyabb szabad t-PA aktivitásáért.

4.1.3. A FIBRINOLITIKUS AKTIVITÁS LONGITUDINÁLIS VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI

Nem észleltünk statisztikailag szignifikáns változást az euglobulin lízis időt, a t-PA aktivitást és a PAI-1 aktivitást illetően a 4 hetes periódusban az egészséges önkéntesekben. A PAI-1 aktivitásban tapasztalható volt ugyan fluktuáció, de a változások a normál értéken belül maradtak.

4.1.4. A JÓL ÉS A ROSSZUL REAGÁLÓ STÁTUSZ VÁLTOZÁSA:

Az 1. héten 6 önkéntes tartozott a jól reagáló, 6 a rosszul reagáló csoportba. A vizsgált hetek során kiderült, hogy vannak önkéntesek, akik mindig a jól reagáló (4 fő), akik mindig a rosszul reagáló

(4 fő) csoportba tartoztak és voltak olyanok, akik változtatták a reszponder státuszukat (4 fő). Tehát az önkéntesek 2/3-a mutatott konstans reagáló státuszt. Utóbbinak jelentősége lehet fibrinolízis vizsgálatok tervezésekor, szükséges tehát a reszponder státusz rendszeres ellenőrzése.

4.1.5. A FIBRINOLÍZIS VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI HEREDITER ANTITHROMBINOPATHIÁS BETEGEKBEN

A fibrinolitikus rendszer vizsgálata során 6/11 családnál észleltünk csökkenést az okklúziós teszt előtti fibrinolitikus aktivitásban euglobulin lízis idő módszer alkalmazásával. Okklúziós tesztet követően pedig 7/11 családnál. A t-PA aktivitás okklúziós teszt utáni értéke 1 esetben bizonyult alacsonyabbnak, PAI-1 aktivitás emelkedés viszont 6/11 család esetében volt észlelhető. Vagyis a vizsgált családok több, mint felénél a veleszületett inhibitor defektus mellett a fibrinolitikus rendszer működésének zavara megfigyelhető volt.

4.1.6. ÖSSZEFÜGGÉS A HEREDITER ANTITHROMBINOPATHIÁK ÉS A HEMOREOLÓGIAI PARAMÉTEREK ALAKULÁSA KÖZÖTT

A teljes vér viszkozitás 4/11 családnál, a plazma viszkozitás 6/11 családnál volt emelkedett, a vörösvérsejt aggregációt 1 esetben észleltük fokozottnak. A feltűnően gyakori plazma viszkozitás emelkedés minden esetben a keresztezett immunoelektroforézis módszerrel kóros fehérjével rendelkezőknél fordult elő.

4.1.7. EGYÉB VELESZÜLETETT ÉS SZERZETT RIZIKÓ TÉNYEZŐK, VALAMINT A HEREDITER ANTITHROMBINOPATHIA KAPCSOLATA

A vizsgált rizikó tényezők közül 3 beteg rendelkezett az FV Leiden mutáció heterozigóta formájával, 4 beteg a metilén-tetrahidrofolát reduktáz enzim génjében előforduló C677T pontmutációra bizonyult heterozigótának. FII 20210A allél jelenlétét vizsgálataink egyetlen antithrombinopathiás betegnél sem igazolták. A protein C és S aktivitások, a lupusz anticoagulans meghatározás eredménye valamennyi betegnél normális vagy negatív volt.

4.2. A VELESZÜLETETT PROTEIN C HIÁNYOS BETEGEK VÉRALVADÁSI ÉS GENETIKAI VIZSGÁLATA SORÁN NYERT EREDMÉNYEK

4.2.1. A PROTEIN C GÉNBEEN MUTÁCIÓVAL RENDELKEZŐ BETEGEK VÉRALVADÁSI VIZSGÁLATAINAK EREDMÉNYEI

A mutációval rendelkező 15 család 25 családtagja közül 21 I-s típusú protein C hiányban szenvedett (csökkent protein C aktivitás és antigén szintek), 4 családtagnál igazoltunk II-s típusú protein C hiányt (normális antigén szintek mellett csökkent protein C aktivitás). 3 családnál magasabb fibrinogén szinteket észleltünk, antithrombinopathia I. típus: 1 család 2 tagjánál, II. típus: 2 család 3 tagjánál volt detektálható, APC rezisztencia 5 család (a mutáns családok 33.3%-a) 10 tagjánál igazolódott. Közülük 1 beteg homozigóta, 9 beteg heterozigóta volt a vizsgált mutációra.

4.2.2. A PROTEIN C GÉNBEEN VÉGZETT MUTÁCIÓ SZŰRÉS EREDMÉNYEI

A mutációkat SSCP esetében a migrációban észlelhető különbség alapján, DGGE esetében a heteroduplex képződés okozta abnormalis elektroforetikus mobilitás alapján detektáltuk.

15 család 25 tagjánál (a vizsgált családok 43%-ánál) igazoltuk a fenti szűrőmódszerekkel mutáció jelenlétét, 8 esetben SSCP, 17 esetben DGGE segítségével.

4.2.3. A DNS SZEKVENÁLÁS EREDMÉNYEI

Vizsgálatainkkal 23 esetben 9féle missense mutáció (közülük három új mutáció), 1 esetben nonsense mutáció és 1 esetben ritka frameshift deléció igazolódott. Valamennyi mutációval rendelkező beteg és családtag heterozigótának bizonyult a vizsgált mutációt illetően.

Két különböző missense mutációt igazoltak vizsgálataink két család esetében a protein C gén 3-s exonjában, melyek közül az egyik új, eddig nem közölt mutáció (1493 A – G, 35 Asp – Gly, **PROTEIN C PÉCS 2**). Ez a mutáció a *PROC* gén Gla doménjában foglal helyet, közel ahhoz a hélixhez, mely összeköti a Gla domént az EGF- szerű doménekkel. A genetikai eltérés I-s típusú protein C hiányt okozott. A 3-s exon másik missense mutációja (1432 C – T, 15 Arg – Trp) szerepel az 1995-ben kiadott protein C mutációkat tartalmazó adatbázisban.

Egy probandnál a 7-s exon nonsense mutációját (157 Arg-Stop codon képződés) igazoltuk, mely I-s típusú protein C hiányt és a protein C thrombin általi aktivációjának zavarát okozta. Egy új missense mutációt is igazoltunk a 7-s exonban (6231 G – A, 173 Gly – Glu, **PROTEIN C PÉCS 3**), mely II-s típusú protein C hiányt okozott. Ez a mutáció igen közel helyezkedik el az aktivációs hasítási helyhez (Arg 169 – Leu 170), ahol a thrombin hatására a fehérje nehézláncáról egy dodekapeptid hasad le.

Hat különböző missense mutáció és egy frameshift deléció igazolódott a 9-s exonban 20 családtagnak esetében a protein C génben, tehát magyar betegekben ez volt a mutációk által leggyakrabban érintett exon. II-s típusú protein C hiányt okozó új mutációt sikerült igazolni egy családnál (8476 C – T, 254 Thr – Ile, **PROTEIN C PÉCS**). A mutáció a katalitikus domént érinti, igen közel van a katalitikus triád egyik tagjához (Asp257), nem található meg a protein C génben előforduló mutációk 1995-ben közölt adatbázisában és az azóta közölt irodalomban sem, és co-szegregációt mutat a családban előforduló thromboemboliás megbetegedésekkel. Az új mutációt **PROTEIN C PÉCS**-nek neveztük el. A többi igazolt missense mutáció megtalálható az 1995-ben közölt mutációs adatbázisban.

Ritka frameshift deléciót igazoltunk egy betegnél a 9-s exonban (8796-8801 del G, 364Met Trp, 378 Stop). A beteg heterozigótának bizonyult a vizsgált defektusra, melyet a mutációs adatbázis ugyan említ egy esetben, de kizárólag személyes kommunikáció alapján irodalmi hivatkozás nélkül. Fenotípust illetően I-s típusú protein C hiányt okozott, jelentősen csökkent protein C aktivitás és antigén szintekkel.

4.2.4. A PROTEIN C GÉNEN MUTÁCIÓVAL NEM RENDELKEZŐ BETEGEK EREDMÉNYEI

A vizsgált 34 protein C hiányos családból 19 család 22 tagjánál nem igazolódott mutáció a protein C génben ismételt alacsony protein C anticoagulans aktivitások mellett, de verifikáltunk egyéb genetikai illetve vörösvérsejt eltéréseket. 11 család esetében (a mutációra negatív családok 58%-ában) a protein C aktivitás ismételt határesetnek bizonyult (60-70% között). 1 családnál észleltünk alacsony protein S aktivitást, 9 családnál alacsony APC rezisztenciát igazoltak vizsgálataink. Valamennyi APC rezisztens családnál (a mutációra negatív családok 47%-ánál) igazolódott az V-s faktor Leiden mutációja, 3 esetben homozigóta, 6 esetben heterozigóta formában. Egy 6 hetes csecsemőnél a máj éretlen szekréciós kapacitása és homozigóta FV:Q506 Leiden mutáció jelenléte igazolódott. Lupus anticoagulans 2 családban volt detektálható, mindkét esetben FV:Q506 mutációval kombinálódva. 2 családnál igazoltunk prothrombin gén mutációt (G20210A allél jelenléte), 1 esetben protein S hiánnyal, 1 esetben FV:Q506 mutációval kombinálódva.

8 család esetében (a mutációra negatív családok 23%-ában) semmiféle genetikai eltérés nem igazolódott az ismételt szignifikánsan alacsony protein C aktivitások hátterében sem szűrő módszerekkel, sem szekvenálással. Ez megfelel az irodalmi adatoknak (kb. 20%).

4.2.5. ÖSSZEFÜGGÉS A PROTEIN C AKTIVITÁS ÉS A FV:Q506 (LEIDEN MUTÁCIÓ) ELŐFORDULÁSA KÖZÖTT

Az 300 vénás thromboembolián átesett beteg adatait feldolgozva megfigyelhető volt, hogy a FV:Q506 (Leiden mutáció) jelenlétekor csökken a protein C aktivitás, heterozigóta esetekben kb. 20%-kal, homozigóta esetekben kb. 30%-kal. Homozigóta FV:Q506 (Leiden mutáció) fennállta esetén a protein C aktivitás csökkenés szignifikáns ($p < 0.001$), mind a Leiden mutációt nem hordozók protein C aktivitásához, mind a mutáció heterozigóta formájával rendelkezőkhöz viszonyítva.

5. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

5.1. A FIBRINOLITIKUS RENDSZER VIZSGÁLATA SORÁN NYERT EREDMÉNYEINK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Erős negatív korrelációt igazoltunk az euglobulin lízis idő (ELI) és a t-PA aktivitás között, valamint gyengébb pozitív korrelációt az ELI és a PAI-1 aktivitás között egészséges önkéntesekben. Nem igazolódott korreláció az ELI és a t-PA antigén, valamint az ELI és a PAI-1 antigén szintek között. Megállapítottuk tehát, hogy a t-PA az az aktivátor, mely szerepet játszik a plazma euglobulin frakciójának feloldódásában, vagyis az euglobulin lízis idő az extrinzik fibrinolízist reprezentálja, elsősorban a humán plazma t-PA aktivitását.

2. A vénás okklúziós tesztet követően mért euglobulin lízis idők alapján az egészséges önkéntesek jól és rosszul reagáló csoportra voltak oszthatók.

Szignifikáns különbség volt észlelhető az euglobulin lízis időket és a t-PA aktivitásokat illetően a két csoport eredményei között. A jól reagáló csoportban szignifikánsan rövidebb euglobulin lízis időt és magasabb t-PA aktivitásokat mérünk. Ennek hátterében az a tény állhat, hogy a rosszul reagálók csoportjában több férfi önkéntes volt és ismert, hogy a férfiak fibrinolitikus kapacitása csökkent a nőkhez viszonyítva. Ennek oka az alacsonyabb t-PA aktivitásban, magasabb PAI-1 aktivitásban, magasabb t-PA és PAI-1 antigén szintekben keresendő. A nembeli különbségen kívül lehetséges magyarázat, hogy a rosszul reagáló csoportban szignifikánsan magasabb PAI-1 antigén szinteket mérünk. Vagyis a PAI-1 antigén szint fontos szerepet játszik a t-PA aktivitás meghatározásában elsősorban a t-PA*PAI-1 komplexek létrejötté révén.

3. Az irodalomban elsőként közöltünk a fibrinolízis longitudinális vizsgálata során nyert eredményeket. Megállapítottuk, hogy az ELI, a t-PA és a PAI-1 aktivitásokban, valamint a t-PA és a PAI-1 antigén szintekben nem volt szignifikáns változás a vizsgált 4 hetes periódusban. De ezek mögött a relatíve konstans átlagértékek mögött a normál egyének mutathatnak jelentős különbségeket fibrinolitikus aktivitásaikat illetően. A jól és rosszul reagálók csoportját kialakítva a posztokklúziós eredmények maradtak inkább konstansak, az okklúziós teszt előttiék már mutattak változásokat, elsősorban a t-PA aktivitást és a PAI-1 aktivitásokat illetően.

4. A reszponder státusz a betegek többségénél (2/3-ánál) 4 hetes longitudinális analízis során konstans maradt. A rosszul reagáló státusz klinikai jelentőségének meghatározása egészséges önkéntesekben további követést igényel, 2 évvel a vizsgálatot követően végzett felmérés során az önkénteseknél thromboemboliás megbetegedés nem fordult elő.

5. Az antithrombinopathiás betegeken végzett fibrinolízis vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a betegek több, mint felénél társuló abnormalitásként a fibrinolitikus rendszer zavara is észlelhető volt, és ez fokozta a betegek thromboembolia rizikóját. Ezeknél a betegeknél az euglobulin lízis idő megnyúlását és emelkedett PAI-1 aktivitást igazoltak vizsgálataink.

6. Az antithrombinopathiás családokon végzett hemoreológiai vizsgálatok eredményei alapján a betegek 60%-ánál magasabb plazma-, és kb. 40%-ánál magasabb teljes vér viszkozitás volt igazolható. A viszkozitási paraméterek alakulása szerepet játszik az antithrombinopathiás betegek thromboemboliás megbetegedéseinek kifejlődésében. Az erythrocyta aggregációban érdemi változást vizsgálataink nem igazoltak. FV: Q506 (Leiden mutáció) 3 betegnél, MTHFR C677T allél jelenléte 4 betegnél igazolódott. Protein C és S hiány, FII 20210A illetve lupus anticoagulans egyidejű jelenlétét nem észleltük.

5.2. A CSÖKKENT PROTEIN C AKTIVITÁSSAL RENDELKEZŐ BETEGEK VÉRALVADÁSI ÉS GENETIKAI VIZSGÁLATI EREDMÉNYEINEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. 34 alacsony protein C aktivitással rendelkező család 45 tagjánál végeztünk részletes véralvadási és genetikai vizsgálatokat. Közülük 15 család 25 tagjánál igazoltak vizsgálataink mutációt a protein C génben (44%), közülük három új, az irodalomban eddig nem közölt mutációt, melyek PROTEIN C PÉCS, PROTEIN C PÉCS 2 és PROTEIN C PÉCS 3 néven kerültek regisztrálásra.

A 23 családtagnál 9 féle missense mutáció, 1-nél nonsense mutáció és 1 esetben ritka frameshift deléció igazolódott. Valamennyi mutációval rendelkező beteg és családtag heterozigótának bizonyult a vizsgált mutációt illetően.

2. A leggyakoribb mutáció típus magyar protein C hiányos betegekben a 9-s exon missense mutációja (8604 G – A, 297 Val – Met), mely a katalitikus régióban helyezkedik el. A mutáció szerepel az 1995-ben közölt adatbázisban. Valamennyi betegnél és családtagnál I-s típusú protein C hiányt okozott.

3. Egyéb véralvadási és genetikai eltérések a protein C génben mutációval rendelkező családoknál: 15 család 25 családtagja közül 21 fő I-s típusú, 4 fő II-s típusú protein C hiányban szenvedett. 3 családnál magasabb fibrinogén szinteket észleltünk, antithrombinopathia I. típus: 1 család 2 tagjánál, II. típus: 2 család 3 tagjánál volt detektálható, APC rezisztencia 5 család 10 tagjánál igazolódott (közülük 1 beteg heterozigóta, 9 beteg heterozigóta volt a FV:Q506 mutációra). Vagyis a protein C génben mutációval rendelkező betegek és családtagok 40%-a rendelkezett a FV Leiden mutációjával, prothrombin gén mutáció nem volt igazolható.

4. Irodalmi adatok, a protein C génre vonatkozó mutációs adatbázis és saját vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy veleszületett protein C hiány esetében az igazolt missense mutációk egyértelmű összefüggése a kialakult fenotípussal, vagy a klinikai képpel nem igazolható. Ugyanazon mutációk egyik családban I-s, másokban II-s típusú protein C hiányt hozhatnak létre. A stop kodont létrehozó mutációk és deléciók azonban legtöbb esetben I-s típusú protein C hiányt okoznak és súlyosabb klinikai képpel járnak. Indokolt tehát az adatbázis bővítése, hogy a probléma további kutatására lehetőség nyíljon.

5. Eredményeink alapján FV:Q506 (Leiden mutáció) jelenlétekor csökken a protein C aktivitás (heterozigóta esetben kb 20%-kal, homozigóta esetben kb 30%-kal). A Leiden mutációra homozigóta állapot statisztikailag szignifikáns csökkenést okozott thromboembolián átesett betegek protein C aktivitásában.

6. A genetikai vizsgálatok jelentőségét a normálisnál alacsonyabb protein C aktivitással rendelkező betegekben az adja, hogy segítségükkel identifikálhatók a mutációval rendelkező betegek, akiknél a veleszületett protein C hiány diagnózisa egyértelműen megerősíthető. Ők már az első thromboemboliás eseményüket követően tartós, akár élethosszig tartó anticoaguláns kezelésre szorulnak. Ugyancsak indokolt a borderline protein C aktivitással rendelkező (60 – 70% közötti) betegek genetikai vizsgálata is, hiszen közülük is kerülnek ki mutációt hordozó betegek. A határeseti protein C aktivitással rendelkező betegek jelentős része azonban nem rendelkezik veleszületett protein C hiánnyal, így nem szorul tartós anticoaguláns kezelésre. A véralvadási módszerek nem mindig nyújtanak elegendő segítséget a betegség biztos diagnózisához (ismert tény, hogy átfedés figyelhető meg a normális egyének és a heterozigóta protein C hiányos betegek protein C antigén szintje között).

7. A vizsgált 34 protein C hiányos családból 19 család 22 tagjánál nem igazolódott mutáció a protein C génben ismételt alacsony protein C anticoaguláns aktivitások mellett. A mutációra negatív családok csaknem 60%-ában a protein C aktivitás ismételt határesetnek bizonyult (60-70% között). A mutációra negatív családok 47%-ánál APC rezisztenciát igazoltunk, egyéb véralvadási vizsgálati eredmények negatívak voltak. Valamennyi APC rezisztens családnál igazolódott az V-s faktor Leiden mutációja, 3 esetben homozigóta, 6 esetben heterozigóta formában.

8 család esetében (a vizsgált családok 23%-ában) semmilyen genetikai eltérés nem igazolódott az ismételt szignifikánsan alacsony protein C aktivitások és antigén szintek hátterében sem szűrő módszereket, sem szekvenálással. Ez megfelel az irodalmi adatoknak (kb. 20%). Primereink az exonok (átíródo génszakaszok) és az exon-intron junctionok vizsgálatára alkalmasak, de az irodalmi álláspontnak megfelelően nem kerül sor a nem átíródo génszakaszok (intronok) genetikai vizsgálatára. Nagyobb jelentőséggel bírhatnak a protein C géntől távol eső, de a gén expresszióját befolyásoló reguláló szekvenciák, vagy transzkripciósfaktorok (HNF1, HNF3, HNF6, PCE1 stb.), utóbbiak az átíródás stimulálásában vagy gátlásában vesznek részt, és mutációk jelenléte nélkül is képesek befolyásolni a protein C fehérje koncentrációját.

8. Az általunk alkalmazott szűrő módszerek (PCR+ DGGE, PCR+ SSCP) saját vizsgálataink és irodalmi adatok alapján alkalmasak a protein C génben előforduló mutációk igazolására. A protein C gén 1-s exonjára vonatkozó szűrő módszer a gén 1-s exonját és a promoter régiót is vizsgálja, így a promoter régiót érintő mutációk is verifikálhatók segítségével. A szűrő módszerek negativitása esetén egyetlen esetben sem tudunk DNS szekvenálással mutációt igazolni a protein C génben, s ez módszereink megbízhatóságát jelzi. Fontos, hogy a szűrő módszerek jelentősen csökkentik a szekvenálások számát, így idő és költségkímélő eljárásoknak tarthatók.

9. Három új, korábban az irodalomban nem közölt mutációt írtunk le a protein C génben:

PROTEIN C Pécs (9-s exon, 8476 C – T, 254 Thr – Ile),

PROTEIN C Pécs 2 (3-s exon, 1493 A – G, 35 Asp – Gly),

PROTEIN C Pécs 3 (7-s exon, 6231 G – A, 173 Gly – Glu)

Igazoltunk még egy ritka frameshift deléciót (8796-8801 del G, 364Met – Trp, 378 Stop), melyet a protein C génre vonatkozó mutációs adatbázis kizárólag személyes kommunikáció alapján és nem irodalmi hivatkozással említ.

Mintegy 40 éve ismert, hogy a vénás thrombosis öröklődő megbetegedés lehet. Azóta a koagulációs és a fibrinolitikus rendszer számos új komponense vált ismertté és vizsgálat tárgyává rizikó tényező irányban. Jelenleg 6 abnormalitás elfogadott, mint egyértelmű genetikai rizikó tényező, ezek az antithrombin, protein C, protein S deficienciák, a dysfibrinogenaemia, a FV:Q506 (Leiden) mutáció és a 20210A allél jelenléte a prothrombin génben. Korábban feltételezték, hogy a familiális thrombosisokat egy domináns gén defektusa okozza. Napjainkban a hereditár thrombophiliát multigénis öröklődésű megbetegedésnek tekintjük, ahol más, eddig ismeretlen gének is fontos szerepet játszhatnak, befolyásolva ezzel a megbetegedés penetranciáját. Jelenleg a legfontosabb feladat új rizikó faktorok megismerése, mivel a thrombophiliás családok 30-40%-ánál egyik ma ismert rizikó tényezőt sem lehet igazolni. Ezekben a családokban nagy valószínűséggel ma még ismeretlen rizikó faktorok jelenléte okozza a thromboemboliás megbetegedéseket.



A témával kapcsolatos közlemények és absztraktok jegyzéke:

Folyóirat közlemények:

1. Losonczy, H., Nagy, I., **Dávid, M.**: Effects of various doses of SP 54 on fibrinolytic activity in patients with thrombotic diseases. *Folia Haematol. (Leipzig)*, 1988. 115. 388-393.
2. Losonczy, H., **Dávid, M.**, Nagy, I.: Effect of pentosan polysulfate on activated partial thromboplastin time, thrombin time, euglobulin clot lysis and on tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor activities in patients with thromboembolic disease. *Semin. Thrombos. Hemostas.* 1991. 17. 394-398.
3. **Dávid, M.**, Losonczy, H.: Correlation between ECLT, t-PA and PAI-I activity and antigen levels in healthy volunteers. *Fibrinolysis* 1994. 8. Suppl. 2. 31-33.
4. Losonczy, H., **Dávid, M.**, Alizadeh, H., Scholz, M.: Longitudinal analysis of fibrinolysis in healthy volunteers. *Perfusion* 1994. 7. Suppl. 2. 19-24.
5. **Dávid Marianna**, Losonczy Hajna, Nagy Ágnes, Gerlinde Kutscher, Michael Meyer: Szűrő módszerek alkalmazása a hereditár protein C hiány genetikai diagnosztikájában. *Orvosi Hetilap*, 1999. 140. (3). 125-132.
6. Nagy Ágnes, Melegh Béla, **Dávid Marianna**, Alizadeh Hussain, Kecskés Marianna, Vidra Tímea, Molnár Lenke, Szomor Árpád, Losonczy Hajna: Genetikai vizsgálatok szerepe véralvadási betegségek diagnosztikájában. *Magyar Belorvosi Archivum*, 1999. 52. 67-72.
7. **Dávid M.**: A heveny tüdőembolia antikoaguláns kezelése nem frakcionált és kis molekulatömegű heparinnal. Heparin indukálta thrombocytopenia. *Medicina Thoracalis* 2000. 53. 41- 46.
8. **Dávid, M.**, Losonczy, H., Sas, G., Nagy, Á., Kutscher, G., Meyer, M.: Identification of mutations in 15 Hungarian families with hereditary protein C deficiency. *British Journal of Hamatology* 2000. 111. 129-135.
9. Kuslos T., Szabó I., **Dávid M.**: Fragminnal szerzett tapasztalataink arthroplastícán átesett ortopédiai betegek prolongált prophylaxisában. *Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet, Plasztikai Sebészet* 2001. 44. 1. 28- 38.
10. **Dávid M.**: Velezületett és szerzett thrombosis készség, diagnosztikai és terápiás kérdések *Transzfúzió* 2001. 34. 6. 35- 49.

Könyvfejezetek:

1. Losonczy, H., Nagy, I., **Dávid, M.**: SP 54 loading test. Its significance in the indication and control of long term SP 54 therapy. In: Thrombosis and Haemorrhagic disorders. Eds.: H. Sinzinger, H. Vinazzer. Medicus Verlag. 1989. pp. 336-431.
2. **Dávid, M.**, Losonczy, H., Nagy, I.: 250 és 500 mg orálisan alkalmazott Natrium-Pentosanpolysulphate (PPS) hatása a haemostasis egyes paramétereire. In: PPS Symposium. Ed.: Kollár L. 1991. pp. 9-22.
3. **Dávid, M.**, Losonczy, H.: The examination of the fibrinolytic system in healthy volunteers. Trends in Haemostasis 1995., Eds. H. Losonczy, **M. Dávid**, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1995. pp. 39- 46.
4. Losonczy, H., **M. Dávid**, Alizadeh, H.: 'Good' and 'bad' responders to stimulation of fibrinolysis in healthy volunteers. Trends in Haemostasis 1995., Eds: H. Losonczy, **M. Dávid**, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1995. pp.28- 38.
5. Nagy, Á., Losonczy, H., **Dávid, M.**, Melegh, B., Schröder, W., Hermann, F.H.: Prevalence of Factor V(G1691A) Mutation in South-West Hungarian Thrombophilia Patients In: Molekulargenetik Hereditärer Hämostasedefekte. Ed: F.H. Hermann, Pabst. 1996. pp.117-124.
6. Nagy, Á., Schröder, W., **Dávid, M.**, Molnár, L., Hussain, A., Hermann, F.H., Losonczy, H.: Homozygous Form of Leiden Mutation Combined with Type II Inversion in two Hemophilic Patients. In: Molekulare (DNA) Diagnostik Hereditärer Hämostasedefekte. Ed: F.H. Hermann 5. Greifswalder Hämophilie – Tagung 1998. pp. 54-57.
7. Losonczy, H., Nagy, Á., **Dávid, M.**, Batthyány, I., Szörös, A., Örkényi, M., Meyer, M.: Clinical Features of 26 Thrombophilia Patients with Heterozygous FV:Q506 Mutation. In: Molekulare (DNA) Diagnostik Hereditärer Hämostasedefekte. Ed: F.H. Hermann 5. Greifswalder Hämophilie - Tagung 1998. pp. 175- 184.

Könyvszerkesztés:

1. Trends in Haemostasis 1995. Eds: H. Losonczy, **M. Dávid** Akadémiai Kiadó, Budapest, 1995.



Kézhező absztraktok jegyzéke:

1. Losonczy, H., Nagy, I., Dávid, M.: Effect of 250 and 500 mg pentosan polysulfate on t-PA and PAI-1 activity. Abstract. Thrombos. Haemostas. 1991. 65. 1133.
2. Losonczy, H., Dávid, M., Nagy, I., Menyhei, G.: Treatment of chronic venous insufficiency (CVI) with the combination of coumarin and pentosan polysulfate (PPS). Thrombos. Haemostas. 1993. 69. 1056.
3. Losonczy, H., Dávid, M., Battyány, I., Horváth, L.: Successful treatment of an anticoncipient caused abdominal vein thrombosis with combination of coumarin and sodium pentosan polysulfate (PPS). Thrombos. Haemostas. 1993. 69. 1216.
4. Losonczy, H., Dávid, M., Battyány, I., Horváth, L.: Abdominal vein thrombosis caused by pill in a young patient with later manifestating myelo-proliferative disease (Therapeutical problems). Magyar Belorv. Arch. Suppl. 1993. Vol. 46. 50.
5. Losonczy, H., Dávid, M., Alizadeh, H., Scholz, M.E.: "Good" and "bad" responders to stimulation of fibrinolysis in healthy volunteers. Thromb Haemost 1995. (Suppl) 73:1147.
6. Dávid, M., Nagy, Á., Losonczy, H.: Coagulation and genetic analysis of a family with inherited resistance to activated protein C. Abstr. Haemostasis 1996. 26/3. 490.
7. Losonczy, H., Nagy, Á., Dávid, M., Odegaard, O.R.: Activated Protein C Resistant Cases Combined with Protein S Deficiency. Haemostasis 1996. 26/3. 495.
9. Nagy Á., Dávid M., Melegh B., Losonczy H.: FV:Q506 (Leiden) mutáció előfordulása thrombophilias betegekben. Magyar Belorv. Arch. 1997. Suppl. 50. 1. 33.
10. dr. Nagy Ágnes, dr. Dávid Marianna, dr. Melegh Béla, dr. Losonczy Hajna: Hematológiai betegségek genetikai diagnosztikája. Magyar Belorv. Arch., 1997. Suppl. 50, 2. 108.
11. Dávid Marianna, Michael Meyer, Losonczy Hajna: A hereditær Protein C hiány genetikai diagnosztikája. Magyar Belorv. Arch. 1997. Suppl. 50. 2. 109.
12. Losonczy, H., Nagy, Á., Dávid, M., Kecskés, M., Vidra, T., Nagy, I.: Inherited coagulation inhibitor defects in Hungarian Thrombophilia Patients. Haemostasis 15th International Congress on Thrombosis, Antalya, Turkey, 1998. 244.

13. Nagy, Á., Melegh, B., Dávid, M., Kecskés, M., Vidra, T., Losonczy H.: Prevalence of factor V(G1,961) mutation in Hungarian population and in venous thrombophiliacs. Haemostasis. 15th International Congress on Thrombosis, Antalya, Turkey, 1998. 400.

14. Dávid, M., Losonczy, H., Nagy, Á., Kutscher, G., Meyer, M.: Mutation screening in Hungarian subjects with low protein C activity. Haemostasis. 15th International Congress on Thrombosis, Antalya, Turkey, 1998. 432.

15. Nagy Ágnes, Dávid Marianna, Melegh Béla, Alizadeh Hussain, Losonczy Hajna: Leiden-mutáció prevalenciája magyar populációban egészséges egyéneknél és vénás betegségeknél. Magyar Belgyógyász Társaság XXXVII. Nagygyűlése, Budapest, 1998. Magyar Belorvosi Archivum, 1998. S3. 279.

16. Meyer, M., Dávid, M., Kutscher, G., Eberl, W., Vogel, G., Losonczy H.: Mutation spectra in German and Hungarian Protein C deficient patients with venous thrombosis. Thromb. Haemostas 1999. Aug. Suppl. S2358.

Előadások egyéb absztraktokkal:

1. Losonczy, H., Nagy, I., Dávid, M.: Die Wirkung verschiedener Dosen von SP 54 auf die Fibrinolytische Aktivität bei Patienten mit thrombotischen Erkrankungen. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaft für Hematologie und Onkologie 1987. Würzburg. No. 376.

2. Losonczy, H., Nagy, I., Dávid, M.: SP 54 terhelés és kezelés fibrinolysis csökkenéssel járó thromboembóliákban. XII. Haematológiai Napok Budapest 1988. Abstr. vol. p.80.

3. Losonczy, H., Nagy, I., Dávid, M.: Pentosan polysulphate (SP 54) in the primary and secondary prevention of thromboembolic diseases. V. Czechoslovak-Hungarian Symposium of the Hematologic and Transfusiology Societies. Banská Bystrica, 1990. Abstr. vol. p.17.

4. Losonczy, H., Dávid, M., Nagy, I.: Effect of Pentosan Polysulfate on the t-PA and PAI levels in patients with thromboembolic disease. Chicago Satellite Symposia of the Xth International Congress on Fibrinolysis. 1990. Abstract Book p. 98.

5. Losonczy, H., Dávid, M., Alizadeh, H.: Longitudinal analysis of fibrinolytic activity in healthy volunteers. 9th Meeting of the Danubian League Against Thrombosis and Haemorrhagic Disorders. Abstracts. Series Coagulation Eds.: F.Kornalik, Z.Vorlová, H.Vinazzer. 1994. p.39.



6. Nagy, Á., Schröder, W., Dávid, M., Molnár, L., Hermann, F.H., Losonczy, H.: Bleeding symptoms in two patients with haemophilia A carrying type II inversion and homozygous form of Leiden mutation. 29. Hämophilie-Symposium 1998 in Hamburg, S72.
7. Dávid M., Losonczy H., Sas G., Nagy Á., Kutscher G., Meyer M.: A hereditær Protein C hiányról 35 magyar család genetikai vizsgálata alapján. (referátum) A Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság V. Kongresszusa, 1999. (Alsópáhok) MTHT Program 8.
8. Losonczy H., Nagy Á., Dávid M.: Veleszületett thrombophilák Dél-Dunántúlon. A Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság V. Kongresszusa, 1999. (Alsópáhok) MTHT Program 15.
9. Nagy Á., Dávid M., Losonczy H.: Kombinált defectusok jelentősége thromboemboliás megbetegedésekben. A Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság V. Kongresszusa, 1999. (Alsópáhok) MTHT Program 16.
10. Alizadeh Hussain, Nagy Ágnes, Molnár Lenke, Dávid Marianna, Szomor Árpád, Vidra Timea, Losonczy Hajna: Kumarinneccrosis és heparin okozta Quincke-oedema egy esetünk kapcsán. A Magyar Belgyógyász Társaság Dunántúli Szekciójának XLVI. Vándorgyűlése, Zalaegerszeg (Alsópáhok), 1999. Magyar Belorvosi Archivum, suppl.1. 1999. S49.
11. Dávid, M., Losonczy, H., Sas, G., Nagy, Á., Kutscher, G., Meyer, M.: Genomic analysis of hereditary protein C deficiency in 35 Hungarian families. Thrombophilia and Haemophilia. Clinical and Genetical Aspects. International Symposium, Pécs, 1999. S21.
12. Losonczy, H., Nagy, Á., Dávid, M., Kecskés, M., Vidra, T., Szomor, Á.: Inherited Thrombophilias in Hungarian Patients. Thrombophilia and Haemophilia. Clinical and Genetical Aspects. International Symposium, Pécs, 1999. S23.
13. Losonczy, H., Nagy, Á., Dávid, M., Kecskés, M., Vidra, T., Szomor, Á.: Inherited Thrombophilias in Hungarian Patients. XVth Meeting of the International Society of Haematology, 1999. Durban. Suppl. TH 4.
14. Dávid, M., Losonczy, H., Nagy, Á., Kutscher, G., Meyer, M.: Screening methods in the genetic analysis of Hungarian subjects with hereditary protein C deficiency. XVth Meeting of the International Society of Haematology, 1999. Durban, Suppl. TH 16.